

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 JUL 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

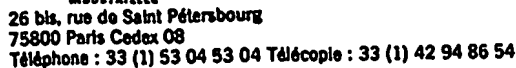
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

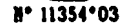
Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



## Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



**BR1**

DB 540 #1/ 210502

**Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page**



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES DATE 23 JUIL 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0309024 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
<b>6 MANDATAIRE (si y a lieu)</b>		DB 540 W / 210502	
Nom		ORES	
Prénom		Béatrice	
Cabinet ou Société		CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	36 rue de St Pétersbourg	
	Code postal et ville	75 010 18 PARIS	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00.	
N° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88.	
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'Inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Le Mandataire,  Béatrice ORES (n° 02-4046)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 	

La présente invention est relative à un procédé de production industrielle d'ARN.

La présente invention est également relative à un système utile pour la production industrielle d'ARN.

5 Il existe en effet un besoin de production en grandes quantités d'ARN, dans l'industrie pharmaceutique pour la production de médicaments (ARN d'interférence, essentiellement) ainsi que pour la recherche sur les ARNs (cristallisation, RMN, complexes). Il existe également un besoin pour l'étude de l'effet de l'arrêt de l'expression d'un gène donné sur la cellule (ARN d'interférence etc...).

10 Pour ce qui concerne, par exemple les méthodes habituellement utilisées pour la production d'ARN, il s'agit notamment de réactions de transcription *in vitro* ou de synthèse chimique.

Les réactions de transcription *in vitro* mettent en œuvre des ARN polymérases de bactériophage (SP6, T7 ou T3). Le rendement de ces réactions de  
15 synthèse et les quantités de produit obtenu est en général limité, notamment en raison de facteurs limitants, telles que les concentrations en nucléotides (effet inhibiteur de concentrations en nucléotides > 8 mM, par exemple), les concentrations des différents éléments constituant le milieu réactionnel et notamment la concentration en ions  $Mg^{++}$ . De manière générale, il est admis que les concentrations en magnésium doivent  
20 être en excès dans les réactions de transcription *in vitro*. L'utilisation de pyrophosphatase, en association avec les ions  $Mg^{++}$  a également été proposée et est considérée comme améliorant le rendement de la réaction de transcription.

Une autre complication rencontrée dans la synthèse *in vitro* de polynucléotides est l'inhibition des polymérases de phages à des concentrations en ions  
25 relativement faibles.

Pour éviter ces différents inconvénients, l'utilisation de milieux réactionnels améliorés a été proposée dans le Brevet US 5,256,555, qui décrit l'utilisation d'un milieu réactionnel comprenant des concentrations totales molaires élevées en nucléotides (entre 12 mM et 40 mM), qui étaient précédemment considérées  
30 rées comme des concentrations inhibitrices, une quantité molaire efficace de  $Mg^{++}$ , qui est sous-saturante eu égard aux concentrations totales molaires en nucléotides, de la pyrophosphatase et des  $Mg^{++}$ -nucléotides ou des Tris-nucléotides.

Malgré les différentes améliorations proposées, la transcription *in vitro* pour produire des ARN, présente les inconvénients suivants :

- induction de réactions parasites (activité N+1) qui augmentent l'hétérogénéité des produits de transcription et nécessitent une purification poussée de l'ARN ;

- limitation quant à la quantité et à la taille de l'ARN synthétisé ;  
- coût de production relativement élevé.

La Demanderesse s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à un procédé de production d'ARN qui ne présente pas les inconvénients des procédés habituellement utilisés et qui réponde ainsi mieux aux besoins de la pratique, en ce qu'il permet de synthétiser n'importe quel ARN d'intérêt en grandes quantités ou avec un rendement élevé et à un coût significativement inférieur à celui obtenu avec les méthode *in vitro* de l'art antérieur.

La présente invention a pour objet un procédé de production de molécules d'ARN, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

(1) la transformation de cellules de levure, notamment de *S. cerevisiae*, dépourvues d'ADN mitochondrial (cellules rho<sup>0</sup>) avec un vecteur de transcription mitochondriale comprenant l'ADN codant l'ARN d'intérêt, des éléments régulateurs de la transcription mitochondriale, de la maturation des ARN et de leur stabilité et un gène rapporteur de la transformation mitochondriale ou un fragment dudit gène rapporteur ; le procédé selon l'invention permet ainsi la transcription de toute séquence d'ADN quelle que soit son origine intra ou inter-spécifique (y compris des ADN d'origine mitochondriale ou chloroplastique), ainsi que des séquences d'ADN synthétique n'existant pas dans la nature ; on obtient ainsi un transformant mitochondrial ou une souche rho<sup>-</sup> synthétique.

(2) l'identification des transformants mitochondriaux de levure ayant incorporé l'ADN d'intérêt,

(3) la culture des transformants mitochondriaux de levures sélectionnées à l'étape (2), de préférence jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance,

(4) l'isolement des mitochondries, à partir des transformants mitochondriaux de levure obtenues à l'étape (3) et

(5) l'extraction et la purification de l'ARN d'intérêt obtenu, à partir desdites mitochondries.

Dans les conditions du procédé selon l'invention, l'ARN obtenu est stable.

5 Définitions (voir figures 2 à 4)

- Souches  $\rho^+$  : dans ces souches, l'ADN mitochondrial est intègre et fonctionnel ; elles incluent aussi bien des souches sauvages que des souches mutantes, telles que les souches  $\rho^+$  mit<sup>-</sup> (figure 2).

10 - Mutants  $\rho^0$  : mutants qui ont perdu totalement leur ADN mitochondrial, ce qui conduit à une perte de croissance respiratoire de la levure mais à une persistance de la croissance fermentaire. En effet, certains gènes mitochondriaux codent pour des sous-unités essentielles de la chaîne respiratoire, et le reste pour le système de traduction protéique de la mitochondrie. Il n'y a donc plus du tout de protéines codées par le génome mitochondrial dans une souche  $\rho^0$  (figure 2).

15 - Mutants  $\rho^-$  : dans ce type de mutant, l'ADN mitochondrial a subi de larges délétions (>50%) rendant celui-ci non fonctionnel. L'ADN mitochondrial conservé est répété bout à bout pour reconstituer une molécule de taille équivalente à une molécule d'ADN mitochondrial  $\rho^+$ . Cependant dans toute souche  $\rho^-$ , des éléments du système de synthèse protéique mitochondriale sont perdus (car répartis tout  
20 au long du génome mitochondrial) mais l'ADN mitochondrial restant peut toujours être transcrit en ARN (seulement dépendant de facteurs nucléaires) (figure 2).

La mutation  $\rho^-$  conduit donc à une absence de toutes les protéines codées par l'ADN mitochondrial, comme une souche  $\rho^0$ . Le phénotype décrit comme *petite colonie* correspond donc autant à une  $\rho^-$  qu'à une  $\rho^0$ .

25 - Souche  $\rho^-$  synthétique : c'est une souche initialement  $\rho^0$  dans laquelle on a artificiellement fait entrer de l'ADN dans les mitochondries (grâce à une technique de bombardement (biolistique). On utilise une propriété des levures qui est de pouvoir répliquer et maintenir n'importe quel fragment d'ADN circulaire dans ses mitochondries en l'absence d'ADN mitochondrial (un vecteur bactérien par exemple).  
30 Le fragment introduit est alors répété bout à bout plusieurs fois pour reconstituer une molécule d'ADN de taille équivalente à une molécule d'ADN mitochondrial  $\rho^+$ . Dans les mitochondries de telles cellules, une séquence d'ADN quelconque insérée

entre des séquences permettant la transcription mitochondriale pourra effectivement être transcrite. Par contre, la traduction ne pourra se faire car les éléments nécessaires, normalement présents dans l'ADN mitochondrial, sont ici absents. C'est donc pour ces propriétés proches de celles de cellules *rho*<sup>-</sup> (naturelles) que de telles cellules ont  
 5 été appelées par analogie *rho*<sup>-</sup> synthétiques (figure 4).

- Mutants *mit*<sup>-</sup> : mutants qui comprennent une mutation dans l'ADN mitochondrial qui affecte spécifiquement la fonction respiratoire (mutants localisés dans l'un des divers gènes des sous-unités mitochondriales des complexes respira-  
 10 toires) mais qui n'affecte pas la fonction de traduction protéique des mitochondries.

- Transformants mitochondriaux : ils sont obtenus directement après un bombardement des cellules (biolistique). Si on bombarde des *rho*<sup>0</sup>, les transformants mitochondriaux sont des *rho*<sup>-</sup> synthétiques. Tout vecteur peut être utilisé pour les bombardements, mais si on veut identifier facilement les transformants mitochon-  
 15 driaux, il faut un gène mitochondrial marqueur (ou partie).

- Recombinants mitochondriaux : ils sont obtenus par recombinaison homologue après mise en présence de la souche *rho*<sup>-</sup> synthétique et de cellules *rho*<sup>+</sup>.

- Marqueur d'auxotrophie : mutation dans un gène connu de la voie de biosynthèse ou d'utilisation d'un acide aminé, d'un nucléotide, d'un substrat carboné, etc ...

20 De manière surprenante, le procédé selon l'invention :

- est facilement industrialisable (utilisation de fermenteurs classiques) et

- permet effectivement d'obtenir l'ARN d'intérêt en quantités importantes, pour un faible coût, après une purification aisée à mettre en place.

25 En outre, il présente les avantages suivants :

- le fait qu'il inclue une synthèse *in vivo*, dans des levures, de l'ARN d'intérêt, lui permet de bénéficier de tous les contrôles de qualité cellulaire, notamment une grande fidélité de transcription, minimisant considérablement les risques d'erreur d'incorporation (par plusieurs ordres de grandeur par rapport aux procédés  
 30 existants),

- les coûts de fabrication sont essentiellement indépendants de la longueur de l'ARN et de la quantité d'ARN produite. En effet, une fois la souche

productrice de l'ARN d'intérêt construite, les coûts de production seront essentiellement, constitués par l'achat de réactifs peu onéreux (milieux de culture et produits pour la purification de l'ARN), alors que les procédés de l'Art antérieur utilisent des réactifs très onéreux (nucléotides, kits enzymatiques) en grandes quantités.

5 Un tel procédé constitue donc une alternative particulièrement avantageuse aux procédés de production d'ARN *in vitro*, selon l'art antérieur.

En effet, la levure est un hôte de choix, dans le procédé selon la présente invention, car il n'y a pas d'édition dans ses mitochondries ; en conséquence, les molécules d'ARN produites ne seront donc pas modifiées post-transcriptionnellement, même si elles sont produites *in vivo*.

10 Dans l'état de la technique, les transformations génétiques mitochondriales chez *S. cerevisiae* visent à exprimer des protéines marqueurs, mais aussi à introduire dans l'ADN mitochondrial des mutations créées *in vitro* auparavant sur la séquence correspondante clonée ; c'est la première fois qu'il est montré que des cellules de levure dépourvues d'ADN mitochondrial (cellules  $\rho^0$ ), peuvent être utilisées pour la production industrielle *in vivo* d'ARN d'intérêt.

Par exemple l'article de N. Bonnefoy et al. (*Meth. Enzymol.*, 2001, 150, 97-111) résume les propriétés et les caractéristiques génétiques mitochondriales de *S. cerevisiae* et notamment les phénotypes associés à l'expression des gènes mitochondriaux, la réplication de l'ADN mitochondrial, la recombinaison et la ségrégation de l'ADN mitochondrial. En outre, cet article étudie la procédure de transformation de levures via leur bombardement à l'aide d'ADN exogène adsorbé sur des particules. De manière plus précise, le système exposé dans cet article met en œuvre une séquence d'intérêt qui est de l'ADN mitochondrial et qui comporte le gène marqueur.

25 Contrairement à ce qui est exposé dans cet article, l'invention met en œuvre des cellules  $\rho^-$  synthétiques construites à partir de cellules  $\rho^0$ , aptes à produire un ARN d'intérêt présélectionné. Dans l'invention, d'une part, la séquence d'intérêt n'a généralement aucun rapport avec de l'ADN mitochondrial, et d'autre part le marqueur est une séquence mitochondriale, par exemple, le gène *COX2*, qui permet  
30 d'identifier les transformants mitochondriaux (« marker rescue ») (figure 3).

Selon un premier mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, préalablement à l'étape (1), ledit ADN codant l'ARN d'intérêt est amplifié pour être cloné dans ledit vecteur de transcription mitochondriale.

Conformément à l'invention, l'ADN codant l'ARN d'intérêt peut être amplifié par PCR. Dans un tel cas, les amorces oligonucléotidiques sont établies de la manière suivante : l'oligonucléotide P1 est complémentaire de la région 5' de l'ADN d'intérêt adjacente au +1 de la transcription. Il comprend un site de restriction permettant le clonage de l'ADN amplifié dans le vecteur de transformation et éventuellement un site facilitant la purification de l'ARN d'intérêt. Le site de restriction peut être clivable et peut être soit sur le plasmide soit sur les amorces. L'oligonucléotide P2 est, lui, complémentaire de la région 3' de l'ADN d'intérêt adjacente au stop de la transcription. Là aussi, l'oligonucléotide comprend un site de restriction pour le clonage de l'ADN amplifié et éventuellement des séquences permettant une purification plus ou moins poussée de l'ARN d'intérêt. Ces séquences ne sont pas forcément dans l'oligonucléotide mais peuvent aussi se trouver sur le plasmide.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, les éléments régulateurs de la transcription mitochondriale, de la maturation des ARN et de leur stabilité contenus dans le vecteur de transcription mitochondriale sont avantageusement une unité de transcription.

On peut citer notamment les séquences signal d'expression de Cox2 et de Cox1. Les séquences des autres gènes mitochondriaux peuvent également être utilisées.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, le gène rapporteur de la transformation mitochondriale est avantageusement un gène codant pour l'une des protéines de la chaîne respiratoire de levure [gènes de l'apocytochrome b et des sous-unités I, II et III de la cytochrome-oxydase (COX)] ou un gène mitochondrial de l'ATP synthase.

De manière préférée, le vecteur utilisé est un vecteur d'origine bactérienne, par exemple pUC18, comprenant un gène rapporteur de la transformation mitochondriale ou un fragment de celui-ci (COY2, par exemple). Conformément à l'invention, lorsqu'un tel vecteur est mis en œuvre, seuls deux ARNs sont donc

Selon un premier mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, préalablement à l'étape (1), ledit ADN codant l'ARN d'intérêt est amplifié pour être cloné dans ledit vecteur de transcription mitochondriale.

Conformément à l'invention, l'ADN codant l'ARN d'intérêt peut être amplifié par PCR. Dans un tel cas, les amorces oligonucléotidiques sont établies de la manière suivante : l'oligonucléotide P1 est complémentaire de la région 5' de l'ADN d'intérêt adjacente au +1 de la transcription. Il comprend un site de restriction permettant le clonage de l'ADN amplifié dans le vecteur de transformation et éventuellement un site facilitant la purification de l'ARN d'intérêt. Le site de restriction peut être clivable et peut être soit sur le plasmide soit sur les amorces. L'oligonucléotide P2 est, lui, complémentaire de la région 3' de l'ADN d'intérêt adjacente au stop de la transcription. Là aussi, l'oligonucléotide comprend un site de restriction pour le clonage de l'ADN amplifié et éventuellement des séquences permettant une purification plus ou moins poussée de l'ARN d'intérêt. Ces séquences ne sont pas forcément dans l'oligonucléotide mais peuvent aussi se trouver sur le plasmide.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, les éléments régulateurs de la transcription mitochondriale, de la maturation des ARN et de leur stabilité contenus dans le vecteur de transcription mitochondriale sont avantageusement une unité de transcription comprenant un promoteur de transcription et un terminateur convenable.

On peut citer notamment les séquences signal d'expression de Cox2 et de Cox1. Les séquences des autres gènes mitochondriaux peuvent également être utilisées.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, le gène rapporteur de la transformation mitochondriale est avantageusement un gène codant pour l'une des protéines de la chaîne respiratoire de levure [gènes de l'apocytochrome b et des sous-unités I, II et III de la cytochrome-oxydase (COX)] ou un gène mitochondrial de l'ATP synthase.

De manière préférée, le vecteur utilisé est un vecteur d'origine bactérienne, par exemple pUC18, comprenant un gène rapporteur de la transformation mitochondriale ou un fragment de celui-ci (COX2, par exemple). Conformément à l'invention, lorsqu'un tel vecteur est mis en œuvre, seuls deux ARNs sont donc

produits dans le système selon l'invention : *COX2* et l'ARN d'intérêt. Il est donc aisé de séparer ces deux ARNs de par leurs tailles respectives, par exemple par électrophorèse, HPLC, RMN, affinité, etc.... Par ailleurs, l'utilisation seulement d'une partie du gène rapporteur implique qu'il n'est pas transcrit et donc rend plus aisée la purification de l'ARN d'intérêt qui se retrouve alors le seul et unique ARN dans les mitochondries.

Ce vecteur peut être amélioré de la manière suivante : en introduisant (i) des séquences permettant une plus grande production de l'ARN d'intérêt par exemple par l'ajout d'une séquence Ori (origine de réplication de l'ADN mitochondrial) de *S. cerevisiae* de manière à accroître l'efficacité de réplication du vecteur dans les mitochondries et/ou (ii) des séquences facilitant la purification de l'ARN et éventuellement permettant de se débarrasser de séquences de maturation ; pour tester la transformation mitochondriale dans le vecteur de transformation mitochondriale, le gène codant pour un élément de la chaîne respiratoire et notamment le gène *COX2* peut être remplacé par une région de ce même gène permettant la complémentation par recombinaison homologue d'un allèle mit- de *COX2* présent dans la souche testrice de la transformation. L'ARN d'intérêt sera alors le seul et unique ARN présent dans les mitochondries de la souche rho<sup>-</sup> synthétique.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, la transformation selon l'étape (1) comprend la fixation dudit vecteur de transcription mitochondriale sur des billes métalliques (tungstène ou or) et la projection desdites billes sur lesdites cellules, de manière connue en soi, conformément par exemple au procédé de biolistique tel que décrit dans l'article de N. Bonnefoy et al., (*Methods in Enzymology*, 2001, 350, 97-111). L'appareil utilisé est par exemple un système PDS-1000/He (BioRad). Cet instrument utilise une onde de choc à l'hélium pour l'accélération de particules microscopiques en direction d'un tapis de cellules sur une boîte de Pétri. Ces particules font une taille de 0,45 µm, ce qui représente environ 10 % de la taille d'une cellule de levure. Dans un nombre limité de cellules, ces microprojectiles traversent la paroi de la levure et atteignent la mitochondrie. Les mitochondries des cellules rho<sup>0</sup> ne contenant pas d'ADN propre, l'ADN introduit par biolistique est le seul ADN présent dans ces organites et l'on obtient ainsi des cellules rho<sup>-</sup> synthétiques.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, les cellules de levure dépourvues d'ADN mitochondrial sont avantageusement des souches  $\rho^0$  ou des souches  $\rho^0$  modifiées ; on peut citer, à titre indicatif comme souches  $\rho^0$  modifiées, les souches suivantes : les souches  $\rho^0$ , dérivées de la souche DBY947 : ATCC 201440 (MCC109 $\rho^0$  [MATa, ade2-101, ura3-52, kar1-1 (5  $\rho^0$ )]), ATCC 201442 (MCC123 $\rho^0$ [MATa, ade2-101, ura3-52, kar1-1 ( $\rho^0$ )] et DFS160 $\rho^0$  (M.E. Sanchirico et al., EMBO J., 1998, 17, 19, 5796-5804. d ; Steele et al., PNAS, 1996, 93, 5253-5257).

Lesdites souches peuvent en outre avantageusement être modifiées de telle sorte que les gènes codant certaines protéines de dégradation de l'ARN spécifiques de la mitochondrie sont modifiés ou éliminés. On connaît à ce jour plusieurs protéines mitochondriales, toutes d'origine nucléaire (par exemple Suv3p, une sous-unité d'une exoribonucléase 3'-5') qui interviennent dans le turn-over des ARNs mitochondriaux. En utilisant des souches de levure dans lesquelles les gènes de ces 15 protéines ont été éliminés (ces souches sont disponibles), on pourra accroître artificiellement la stabilité des ARNs synthétisés dans la mitochondrie par le procédé selon l'invention.

La majorité des protéines mitochondriales sont d'origine nucléaire. C'est le cas en particulier pour la machinerie protéique nécessaire à la transcription de 20 l'ADN en ARN. Cette machinerie est donc importée vers la mitochondrie et reste fonctionnelle même lorsque les cellules sont  $\rho^0$  et donc dépourvues d'ADN mitochondrial. Par contre, une partie de la machinerie de traduction de l'ARN en protéine est codée par le génome mitochondrial. Par conséquent, si le génome mitochondrial est absent —c'est le cas dans les cellules  $\rho^0$  synthétiques, l'ADN étranger introduit 25 dans la mitochondrie n'est pas traduit en protéine. Dans ce contexte, l'ADN introduit par biolistique est le seul ADN présent dans les mitochondries des cellules  $\rho^0$  synthétique obtenues. Il sera transcrit en ARN mais cet ARN ne sera pas traduit en protéine.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, 30 l'étape (1) comprend la co-transformation de la levure avec ledit vecteur de transcription mitochondriale et un vecteur réplcatif chez la levure comprenant un marqueur de

sélection nucléaire, par exemple pFL46L (LEU2) (ATCC n° 77210) ou Ycp351 (LEU2) (ATCC n° 37672) (figure 4).

De manière avantageuse, ledit marqueur nucléaire complémente un marqueur d'auxotrophie de la souche transformée. En effet, c'est le gène sauvage  
 5 porté par le plasmide qui vient complémenter fonctionnellement le gène muté porté par la souche transformée.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, l'étape (2) comprend :

(a<sub>0</sub>) le croisement des levures transformées rho<sup>-</sup> synthétiques, obtenues à l'issue de l'étape (1), avec une souche testrice de levure de type rho<sup>+</sup> mit<sup>-</sup>, pour faciliter l'identification desdites cellules transformées, et dans laquelle est présente une mutation ponctuelle dans une région correspondant au gène rapporteur de la transformation mitochondriale utilisée à l'étape (1), par exemple l'un des gènes de la chaîne respiratoire (par exemple COX2) et dont la séquence sauvage correspondante  
 10 est portée par le vecteur de transcription mitochondriale utilisé pour transformer la mitochondrie de la souche hôte rho<sup>0</sup> à l'étape (1),  
 15

(b<sub>0</sub>) l'identification des transformants mitochondriaux (cellules rho<sup>-</sup> synthétiques) qui donnent, une fois croisés, des cellules diploïdes, capables de croître sur un milieu non fermentescible : seules les cellules de la souche hôte qui contiennent dans leurs mitochondries le vecteur de transcription mitochondriale portant le gène d'intérêt et l'allèle sauvage de la mutation mit<sup>-</sup> présente dans l'ADN mitochondrial de la souche testrice donneront, après recombinaison des ADNs mitochondriaux parentaux, des cellules diploïdes recombinantes rho<sup>+</sup> mit<sup>+</sup> qui seront mises en évidence par leur capacité à croître sur un milieu non fermentescible, après réplique au velours des  
 20 diploïdes sur un tel milieu. Sur ce milieu, par exemple, dans le cas où le gène marqueur est incomplet (séquence partielle), ni les parents du croisement (souche hôte rho<sup>0</sup> et souche testrice rho<sup>+</sup> mit<sup>-</sup>), ni les diploïdes non-recombinants rho<sup>+</sup> mit<sup>-</sup> issus de ce croisement ne seront capables de croître. Cette étape permet de cerner sur la boîte initiale obtenue après bombardement de la souche hôte rho<sup>0</sup> des zones où se trouvent  
 25 des cellules de cette souche hôte dont les mitochondries ont acquis le vecteur de transcription mitochondriale portant le gène d'intérêt et  
 30

(c<sub>0</sub>) la répétition dudit croisement jusqu'à obtention de colonies de levures isolées, identifiées comme étant des transformants mitochondriaux porteurs du vecteur de transformation mitochondriale (cellules  $\rho^-$  synthétiques).

- De manière plus précise, les transformants nucléaires obtenus après
- 5 bombardement sont croisés avec une souche qui elle possède un ADN mitochondrial  $\rho^+$  mais également une mutation  $\text{mit}^-$  qui l'empêche de croître sur un milieu respiratoire, et qui se trouve couverte par le gène marqueur (tout ou en partie) présent dans la  $\rho^-$  synthétique. De cette façon, après croisement, l'ADN mitochondrial muté et la séquence sauvage correspondante sur la  $\rho^-$  synthétique vont être en présence. La
- 10 recombinaison homologe permettra alors de corriger la mutation  $\text{mit}^-$  et les diploïdes obtenus retrouveront une croissance respiratoire, d'où le terme de « marker rescue ». En pratique : on considère 1000 à 10000 transformants nucléaires répartis sur la boîte après bombardement parmi lesquels on veut identifier ceux qui sont aussi des transformants mitochondriaux. On réplique donc cette boîte au velours (pour garder la
- 15 même disposition des clones sur la boîte de Pétri) sur une boîte du même milieu (boîte de garde) et sur un tapis de la souche testrice  $\rho^+ \text{mit}^-$ . Après croisement cette dernière est répliquée sur un milieu respiratoire pour repérer les clones qui ont permis le sauvetage par le marqueur ou « marker rescue ». On revient alors à la boîte de garde (non croisée, réplique de la boîte originelle) et on récupère les clones  $\rho^-$  synthétiques
- 20 haploïdes correspondants car ce sont eux qui sont sélectionnés *in fine* (figure 4).

- En d'autres termes, les deux souches qui sont croisées à l'étape (a<sub>0</sub>) ne peuvent pas croître sur un milieu non fermentescible. Il sera donc facile de repérer les clones recombinants qui ont recouvré la capacité de croître sur ce type de milieu. Il n'est donc pas nécessaire de sélectionner les diploïdes sur un milieu spécifique (au
- 25 niveau des marqueurs d'auxotrophie) avant de répliquer les croisements sur un milieu non fermentescible. Seules les cellules de la souche hôte qui contiennent dans leurs mitochondries le vecteur de transcription mitochondriale pourront donner, après croisement, des clones pouvant croître sur un milieu non fermentescible.

- Plusieurs cas sont possibles : diploïdes recombinants mais aussi
- 30 diploïdes non recombinants si le gène marqueur est entier dans le vecteur (complémentation en trans par l'ARN produit par l'ADN de la  $\rho^-$  synthétique), et enfin cytoductants recombinants ou non (la mutation *kar 1-1* d'une des 2 souches retarde la

fusion des noyaux et permet d'obtenir après croisement des haploïdes qui ont quand même subi une fusion des cytoplasmes et donc des mitochondries).

A l'étape ( $c_0$ ), la purification des transformants mitochondriaux est effectuée en prélevant sur la boîte de garde (non croisée) la zone dans laquelle on a repéré un clone qui donne, après croisement, une croissance sur un milieu non fermentescible et en répétant le croisement après réétalement des cellules en colonies individuelles ; cette étape ( $c_0$ ) permet donc de sélectionner, au deuxième ou au troisième tour, une colonie d'un transformant mitochondrial pur. En effet, le problème est que parmi 5000 clones sur une seule boîte, on ne peut pas être sûr d'avoir récupéré un clone pur mais seulement une zone mélangée à partir de laquelle il est préférable de purifier la *rho*<sup>-</sup> synthétique. Pour ceci on étale la zone récupérée en colonies individuelles et on refait le même croisement testeur. Après 3 tours environ de purification de cette manière, on obtient un clone pur *rho*<sup>-</sup> synthétique.

En variante, l'étape (2) comprend :

(a<sub>1</sub>) une première sélection ou présélection des cellules de levure à l'aide du marqueur nucléaire, par culture dans un milieu convenable,

(b<sub>1</sub>) une deuxième sélection à partir des cellules de levure sélectionnées en (a<sub>1</sub>), conformément aux étapes (a<sub>0</sub>), (b<sub>0</sub> et ( $c_0$ ), telles que définies ci-dessus.

Par exemple, une fois les cellules *rho*<sup>0</sup> bombardées, elles sont incubées à 28°C, température optimale de croissance de la levure. Dans un premier temps, les cellules sont incubées sur un milieu sélectif dépourvu de l'acide aminé ou du nucléotide correspondant au marqueur d'auxotrophie d'une souche. Cette mutation rend la croissance de la souche dépendante de l'ajout dans le milieu de culture par exemple de l'acide aminé qui ne peut plus être synthétisé. Pour identifier les transformants mitochondriaux effectifs, les levures capables de croître sur milieu sélectif sont croisées avec une souche de signe sexuel adéquat. Cette souche est mit<sup>-</sup>, son ADN mitochondrial est présent, mais le gène *COX2* a été délété. Les diploïdes sont sélectionnés sur un milieu à source de carbone non-fermentescible. Seules les levures dont les mitochondries ont été transformées par le plasmide portant *COX2* peuvent former des diploïdes viables avec la souche mit<sup>-</sup> *cox2*<sup>-</sup> sur ce type de milieu (complémentation par recombinaison ou traduction de l'ARN « sauvage » de *COX2*). Ce croisement

est alors répété jusqu'à obtention de colonies isolées identifiées comme étant des transformants mitochondriaux porteurs de *COX2* (figure 4).

De manière préférée et conformément à l'invention, après croisement avec une souche portant une mutation *mit<sup>-</sup>* dans le gène *COX2*, la complémen-  
 5 tion de cette mutation peut se faire transitoirement en trans par traduction de l'ARN messenger du gène *COX2* apporté par la souche *rho<sup>-</sup>* synthétique, après fusion des réseaux mitochondriaux parentaux. Ce croisement constitue un test pour identifier et sélectionner les transformants d'intérêt en vue de la production de l'ARN d'intérêt.

En d'autres termes, après le bombardement des cellules *rho<sup>0</sup>*, on  
 10 procède tout d'abord et préférentiellement à la sélection des transformants nucléaires. Ils sont nombreux (5 000 par boîte de Pétri), de sorte que les colonies auxquels ils donnent naissance ne sont pas bien séparées les unes des autres. Donc dans un premier temps, les croisements avec la souche testrice (par une réplique au velours) permettront de cerner sur la boîte de tir originale des régions contenant des transformants  
 15 mitochondriaux (en général une dizaine par boîte). Les cellules de cette zone seront diluées et réétalées sur un milieu solide, pour cette fois obtenir des colonies bien séparées. Ces colonies sont à nouveau testées par croisement avec la souche *mit<sup>-</sup>* testrice de manière à identifier celles issues de cellules contenant dans leurs mitochondries l'ADN d'intérêt. Eventuellement, cette étape sera à nouveau répétée si nécessaire pour  
 20 finalement obtenir le transformant d'intérêt sous une forme clonale pure.

Selon un autre mode de mise en œuvre du procédé selon l'invention, l'isolement des mitochondries, conformément à l'étape (4) du procédé selon l'invention, comprend avantageusement, après lyse ou broyage desdites cellules, un isolement des mitochondries selon des méthodes connues en soi (Guérin B. et al.,  
 25 *Methods Enzymol.*, 1979, 55, 149-59) ou en gradient de saccharose.

De manière préférée, l'étape (4) du procédé selon l'invention comprend avantageusement après lyse ou broyage desdites cellules, l'isolement des mitochondries par au moins deux étapes de centrifugation appropriées, à des vitesses de préférence comprises entre 750 g et 12.500 g, et la récupération du dernier culot de  
 30 centrifugation.

Conformément à l'invention, la purification de l'ARN selon l'étape (5) peut être effectuée par des techniques connues en elles-mêmes (di Rago JP. et al., *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 12564-12570).

Toutefois, de manière préférée, la purification de l'ARN selon l'étape (5) comprend avantageusement :

- la lyse du dernier culot de centrifugation obtenu à l'étape (4) contenant les mitochondries, en présence d'au moins un détergent, un chélateur d'ions bivalents et dans une zone de pH entre 7 et 8 ; à titre d'exemple, on peut citer le tampon suivant : SDS 1 %, EDTA 10 mM et Tris HCl pH 7,5 ;
- l'élimination des acides nucléiques contaminants en particulier de nombreux ARNs fixés en périphérie de la mitochondrie, en présence de tampons convenables, comprenant au moins un chélateur d'ions bivalents ; de tels tampons sont notamment des tampons comprenant de l'EDTA et de l'EGTA ;
- l'élimination des ARN cytoplasmiques situés en périphérie des mitochondries et des reliquats d'ADN nucléaire par incubation des mitochondries dans un tampon convenable dépourvu de chélateur d'ions bivalents et en présence de RNase et de DNase ; et
- l'isolement et la purification des acides nucléiques par extractions phénoliques successives.

De manière avantageuse, l'ARN ainsi purifié est dosé, analysé sur gel d'agarose et séquencé.

Egalement de manière avantageuse, ledit ARN peut être utilisé tel quel ou subir des étapes supplémentaires de purification à façon, afin de répondre aux demandes (coupure des séquences de maturation, modification chimique, hybridation en double brin, digestion pour obtenir des fragments de petites tailles couvrant tout le gène etc...).

La présente invention a également pour objet l'utilisation de cellules de levures rho<sup>-</sup> synthétiques, dépourvues d'ADN mitochondrial telles que définies ci-dessus, pour la production industrielle d'un ARN d'intérêt présélectionné.

La présente invention a également pour objet un système utile pour la production industrielle d'ARN d'intérêt présélectionné, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des cellules de levure transformées au moins par un vecteur de transcription mitochondriale (cellules rho<sup>-</sup> synthétiques) comprenant l'ADN codant l'ARN d'intérêt, des éléments régulateurs de la transcription mitochondriale, de la maturation des ARN et de leur stabilité et un gène rapporteur de la transformation mitochondriale ou un fragment dudit gène rapporteur,

- au moins un milieu de culture convenable permettant de sélectionner lesdites cellules transformées (transformants mitochondriaux),

- des cellules de levure testrices, de type rho<sup>+</sup> mit<sup>-</sup>,  
 - des fermenteurs et des milieux de culture appropriés et  
 - des tampons appropriés pour isoler les mitochondries à partir des cellules rho<sup>-</sup> synthétiques et en extraire l'ARN d'intérêt.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre les résultats d'un Northern blot ;
- la figure 2 illustre l'ADN mitochondrial de *S. cerevisiae* ; l'ADN mitochondrial code notamment pour : 3 sous-unités de l'ATP synthase (6, 8, 9) ; 4 sous-unités de la chaîne respiratoire ; 2 ARNr + 1 protéine du mitoribosome ; 24 ARNt ;
- la figure 3 illustre le principe du sauvetage par le marqueur ou « marker rescue » ;
- la figure 4 représente la construction d'une souche rho<sup>-</sup> synthétique.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

#### **EXEMPLE 1 : Matériel et méthodes.**

- 1) Vecteur de transcription mitochondriale :  
 pJM2 (pTZ18-U, avec COX2 sauvage ; YIN J. et al., *Tsinghua Science and Technology*, 1999, 4, 2 ; Bio-Rad) dans lequel a été cloné le gène RIP1<sup>m</sup>,

version en code mitochondrial du gène *RIP1* codant pour une sous-unité du complexe III de la chaîne respiratoire flanqué des séquences signal d'expression de *COX1*.

2) Vecteur navette :

Yep352 (2  $\mu$ , URA3) (ATCC n° 37673).

5           3) Transformation de cellules de *S. cerevisiae* par bombardement de microprojectiles (Biolistic PDS-1000/He) avec les vecteurs tels que décrits en 1) et 2).

W303-1B (ATCC n° 201238)/A/50 : dérivé rho<sup>0</sup> de W303-1B (Mat $\alpha$ , ade2, trp1, his3, leu2, ura3).

4) Méthode d'identification des cellules transformées :

10           Dans un premier temps, on procède à la sélection des transformants nucléaires sur un milieu synthétique dépourvu d'uracile. Les transformants mitochondriaux sont identifiés parmi les transformants nucléaires URA3<sup>+</sup> par leur capacité à produire des diploïdes avec une croissance sur milieu non fermentescible après croisement avec la souche testrice qui ne respire pas TF145 (*MAT $\alpha$ , ade2*) (Speno H. et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 43, 25363-25369) qui porte une mutation de délétion de *COX2* (*cox2-17*) dans l'ADN mitochondrial.

5) Conditions de culture des cellules de levures :

20           Les transformants mitochondriaux sont cultivés en fermenteurs jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance dans un milieu riche contenant du galactose comme source de carbone.

6) Méthode de purification des mitochondries et de l'ARN :

6.1) Isolement des mitochondries

25           Les transformants mitochondriaux de levure sont cultivés en fermenteur jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance soit une DO entre 3 et 4. Ils sont alors récoltés et lysés ou broyés et leurs mitochondries sont purifiées par des méthodes classiques.

Brièvement, le protocole mis en œuvre est le suivant :

30           Les mitochondries des transformants mitochondriaux sont isolées et purifiées après digestion de leur paroi cellulaire avec de la zymolyase dans un milieu (1,35 M sorbitol) protégeant osmotiquement l'intégrité des cellules débarrassées de leur paroi (appelées sphéroplastes). Les sphéroplastes sont soumis à un choc osmotique dans un tampon préservant l'intégrité des mitochondries (0,25 M sucrose, 0,1 M

débris cellulaires (noyaux, parois) sont éliminés par plusieurs (au minimum 2) centrifugations à basse vitesse (750 g) du lysat des sphéroplastes. Le dernier surnageant est centrifugé à haute vitesse (12 500 g) pour culoter les mitochondries.

De manière plus précise, les conditions sont les suivantes :

5 ***I / Récolte des levures***

Les levures sont centrifugées à basse vitesse (4°C, 10 minutes à 3800 g).

***II / 2 Lavages des levures à l'eau distillée glacée***

Les culots sont alors repris dans de l'eau distillée fraîche (4°C).

10 On centrifuge à 4°C, pendant 5 min à 3800 g. On élimine le surnageant et on lave une deuxième fois à l'eau distillée, puis une nouvelle centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions.

***III / Fragilisation de la paroi cellulaire***

15 Le 2-mercaptoéthanol rompt les ponts disulfures entre les différentes mannoprotéines de la paroi, facilitant l'action ultérieure de la zymolyase. A partir de la D.O. 600 nm de la culture, on évalue le poids sec de levure au moyen de la formule suivante :

$$PS \text{ (g)} = 0,28 \text{ DO Volume\_culture (L)}$$

On incube dans un volume de 20 ml de tampon/g de PS.

20 On reprend donc le culot dans un tampon de pré-incubation « SH » (2-mercaptoéthanol 0,5 M, Tris-Base 0,1 M, pH 9,3) et on incube alors pendant 10 min à 30°C avec agitation.

***IV / Lavages des levures au tampon de lavage au KCl***

Le but de ces lavages est d'éliminer toutes traces d'agent réducteur.

25 On ajoute le tampon KCl (KCl 0,5 M, Tris-Base 10 mM, pH 7,0) au tampon de pré-incubation SH. On centrifuge à 4°C, pendant 5 min à 3800 g. On élimine le surnageant. On effectue ainsi 2 lavages successifs au tampon KCl.

***V / Digestion à la Zymolyase à 30°C de la paroi cellulaire***

La zymolyase détruit la paroi cellulaire.

30 La paroi des levures est constituée d'un squelette de chitine auquel s'ajoutent d'autres protéines.

Pour digérer la paroi, une possibilité est d'utiliser la zymolyase produite par la bactérie *Arthrobacter luteus* ou un mélange enzymatique (cytohéli-case) : enzyme de suc gastrique de l'escargot (*Helix pomatia*), donnant alors des protoplastes de levure.

5 On reprend le culot avec la solution de digestion, à raison de 10 à 15 mg de zymolyase/10 ml de tampon de digestion (sorbitol 1,35 M, EGTA 1 mM, acide citrique 10 mM, phosphate disodique 30 mM, pH 5,8).

On arrête la digestion à la zymolyase quand 80 à 90% des cellules sont digérées, en complétant avec le tampon de lavage des protoplastes au KCl.

10 On centrifuge alors pendant 5 min à 12 500 g.

#### ***VI / Lavages des protoplastes***

Le culot est repris rapidement dans le tampon de lavage des protoplastes (ou sphéroplastes = cellules débarrassées de leur paroi) (sorbitol 0,75 M, mannitol 0,4 M, BSA 0,1 %, Tris-Maléate 10 mM, pH 6,8). On centrifuge pendant 5 min à 12 500 g. Le surnageant est éliminé, puis on effectue un deuxième lavage du culot.

#### ***VII / Homogénéisation et broyages***

On reprend les culots dans quelques ml du tampon d'homogénéisation (mannitol 0,6 M, EGTA 2 mM, BSA 0,2 %, Tris-Maléate 10 mM, pH 6,8). On verse la préparation dans un potter. On descend et remonte le potter une dizaine de fois ; on mixe la préparation à vitesse modérée, on récupère un maximum de la préparation puis on redistribue le tout en plusieurs tubes.

#### ***VIII / Isolement des mitochondries par centrifugation différentielle***

25 On centrifuge à basse vitesse (750 g) pendant 8 min, à 4°C. On conserve les surnageants. Le culot peut éventuellement être repris dans le tampon d'homogénéisation, centrifugé et le surnageant ajouté au précédent surnageant.

On centrifuge à plus haute vitesse (12 500 g) pendant 10 min, à 4°C, puis on élimine les surnageants.

30 Les culots sont repris dans le tampon de récupération (mannitol 0,6 M, EGTA 2 mM, Tris-Maléate 10 mM, pH 6,8).

On centrifuge à basse vitesse (8 min, 750 g à 4°C). puis on centrifuge les surnageants à haute vitesse (10 min, 12 500 g, à 4°C). On élimine le surnageant et on refait éventuellement un troisième cycle de centrifugation basse vitesse/haute vitesse.

#### 5 *IX / Récupération finale des mitochondries*

Le culot de mitochondries est repris dans un volume minimum de tampon de récupération (Mannitol, EGTA, Tris-Maléate pH 6,8, tel que défini ci-dessus), puis passé au potter pour l'homogénéiser.

#### *X / Rendement*

10 Pour 2 litres de culture, on produit environ 2-4 g de levures.

Une préparation de mitochondries à la zymolyase permet d'obtenir 1 à 1,5 ml de mitochondries à une concentration de 30 mg/ml de protéines mitochondriales soit 30 à 45 mg de protéines.

#### *. Extraction des ARN*

15 Les mitochondries sont dans un premier temps incubées en présence d'EDTA et d'EGTA pour les débarrasser des polysomes et des ARNs situés en périphérie de la mitochondrie. Puis elles sont lavées en tampon dépourvu d'EDTA et d'EGTA et incubées dans ce même tampon en présence de RNase et de DNase afin de les débarrasser des ARN cytoplasmiques situés en périphérie des mitochondries et des  
20 reliquats d'ADN nucléaire. L'action des RNase et DNase est interrompue par centrifugation à 12 500 g. L'extraction des acides nucléiques est alors réalisée comme décrit par Di Rago et al., 1990. Le culot mitochondrial est lavé en tampon contenant de l'EDTA et de l'EGTA et lysé en présence de SDS 1 %, EDTA 10 mM et Tris HCl pH 7,5. Les acides nucléiques sont purifiés par extractions phénoliques successives. La  
25 phase aqueuse finale est éventuellement lavée par action de chloroforme:acide isoamylique, puis les acides nucléiques sont précipités. A cette étape, l'ADN mitochondrial est éventuellement dégradé par ajout de DNase. L'ARN ainsi purifié est dosé, analysé sur gel d'agarose et séquencé.

30 De manière plus précise, le protocole d'extraction d'ARN mitochondrial est le suivant :

Le tampon de récupération (défini ci-dessus) a été additionné de 10 mM EDTA ; les différentes centrifugations sont effectuées à 4°C.

- Centrifugation 12 500 g 10'
- Récupération dans du tampon de récupération, sans EDTA ni EGTA
- Centrifugation 12 500 g 10'
- 5 - Reprise dans du tampon de récupération sans EDTA ni EGTA.  
Ajout de RNase et de DNase et incubation de 15' à 37°C
- Centrifugation 12 500 g 10'
- Lavages dans du tampon de récupération avec EDTA et EGTA, suivis de centrifugations
- 10 - Reprise dans le tampon de Lyse (SDS 2%, EDTA 10 mM, Tris HCl 10 mM, pH 7,5) et ajout du même volume de mélange phénol : chloroforme : alcool isoamylique 49 : 49 : 2. Vortexer 3', laisser reposer 2' à 4°C, revortexer 2-3'.
- Centrifugation 5' à 8 000 g et à 4°C.
- 15 - Prélèvement de la phase aqueuse et ajout du mélange phénol/chloroforme, environ 5 fois.
- Ajout à la dernière phase aqueuse de 0,3 M d'acétate de sodium pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol 100%. Laisser 15' à -80°C puis centrifuger 20' à 8 000 g à 4°C et laver le culot.
- 20 - Reprendre le culot dans 3 ml de tampon MgCl<sub>2</sub> 10mM, Tris/acétate 20mM, pH 7,4 contenant 75 µl de complexe vanadyl-ribonucléosides (inhibiteur de RNase) 200mM et 2 µl de DNase sans RNase (dans 50% de glycérol à une concentration de 0,5 mg/ml).
- Élimination de la DNase avec un volume
- 25 phénol/chloroforme/alcool isoamylique 49 : 49 : 2, puis un volume de chloroforme/alcool isoamylique 24 : 1, puis un volume de diéthyléther saturé en eau.
- Précipitation des ARN de la phase aqueuse par ajout de 0,3 M d'acétate de sodium et 2,5 volumes d'éthanol 100%.
- Reprise du culot dans 50 à 100 µl d'eau stérile.
- 30 - Dosage et vérification des ARN puis préparation et purification supplémentaire si besoin.

**EXEMPLE 2 : Résultats.**

Les ARNs ainsi obtenus sont analysés par la technique Northern blot avec une sonde spécifique (ADN du gène RIP1) radiomarquée au P<sup>32</sup>.

La figure 1 montre les résultats du Northern blot dont le protocole  
5 est décrit ci-avant. Il apparaît que les ARNs mitochondriaux extraits d'une souche sauvage de levure rho<sup>+</sup> mit<sup>+</sup> (mitochondries normales) réagissaient normalement avec une sonde spécifique du gène mitochondrial endogène cox1 et, aussi, ceux des mitochondries de la souche rho<sup>-</sup> synthétique ne réagissaient pas avec cette sonde. L'analyse des ARNs avec une sonde spécifique du gène RIP1 n'a donné aucun signal  
10 pour le témoin sauvage. Par contre, un signal de taille attendue a été détecté avec les ARNs mitochondriaux de la souche rho<sup>-</sup> synthétique.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les  
15 variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

### **REVENDEICATIONS**

1°) Procédé de production de molécules d'ARN, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- 5 (1) la transformation de cellules de levure  $\rho^0$  dépourvues d'ADN mitochondrial avec un vecteur de transcription mitochondriale comprenant au moins une copie de l'ADN codant l'ARN d'intérêt, des éléments régulateurs de la transcription mitochondriale, de la maturation des ARN et de leur stabilité et un gène rapporteur de la transformation mitochondriale ou un fragment dudit gène rapporteur, pour produire des cellules  $\rho^-$  synthétiques ou transformants mitochondriaux,
  - 10 (2) l'identification des transformants mitochondriaux de levure ayant incorporé l'ADN d'intérêt,
  - (3) la culture des transformants mitochondriaux de levures sélectionnées à l'étape (2),
  - (4) l'isolement des mitochondries, à partir des transformants mitochondriaux de levure obtenues à l'étape (3) et
  - 15 (5) l'extraction et la purification de l'ARN d'intérêt obtenu, à partir desdites mitochondries.
- 2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que préalablement à l'étape (1), ledit ADN codant l'ARN d'intérêt est amplifié pour être cloné
- 20 dans ledit vecteur de transcription mitochondriale.
- 3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que les éléments régulateurs de la transcription mitochondriale, de la maturation des ARN et de leur stabilité contenus dans le vecteur de transcription mitochondriale sont avantageusement une unité de transcription comprenant un promoteur
- 25 de transcription et un terminateur convenable.
- 4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le gène rapporteur de la transformation mitochondriale est avantageusement un gène codant pour l'une des protéines de la chaîne respiratoire ou un gène mitochondrial de l'ATP synthase.
- 30 5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la transformation selon l'étape (1) comprend la fixation dudit vecteur

de transcription mitochondriale sur des billes métalliques (tungstène ou or) et la projection desdites billes sur lesdites cellules.

5 6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les cellules de levure dépourvues d'ADN mitochondrial sont avantageusement des souches  $\rho^0$ , éventuellement modifiées.

7°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape (1) comprend la co-transformation de la levure avec ledit vecteur de transcription mitochondriale et un vecteur répliatif chez la levure comprenant un marqueur de sélection nucléaire.

10 8°) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit marqueur nucléaire est un marqueur d'auxotrophie de la souche transformée.

9°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'étape (2) comprend :

15 (a<sub>0</sub>) le croisement des transformants mitochondriaux de levures obtenus à l'étape (1) avec une souche testrice de levure de type  $\rho^+$  mit

(b<sub>0</sub>) l'identification des transformants mitochondriaux qui donnent, une fois croisés, des cellules diploïdes, capables de croître sur un milieu non fermentescible et

20 (c<sub>0</sub>) la répétition dudit croisement jusqu'à obtention de colonies de levures isolées, identifiées comme étant des transformants mitochondriaux porteurs du vecteur de transformation mitochondriale.

10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'étape (2) comprend :

25 (a<sub>1</sub>) une première sélection ou présélection des cellules de levure à l'aide du marqueur nucléaire, par culture dans un milieu convenable,

(b<sub>1</sub>) une deuxième sélection à partir des cellules de levure sélectionnées en (a<sub>1</sub>), conformément aux étapes (a<sub>0</sub>), (b<sub>0</sub> et (c<sub>0</sub>), telles que définies à la revendication 9.

30 11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'isolement des mitochondries, conformément à l'étape (4) du procédé, comprend avantageusement, après lyse ou broyage desdites cellules l'isolement des mitochondries par au moins deux étapes de centrifugation appropriées,

à des vitesses de préférence comprises entre 750 g et 12.500 g et la récupération du dernier culot de centrifugation.

12°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'étape (5) comprend avantageusement :

- 5                   - la lyse du dernier culot de centrifugation obtenu à l'étape (4) contenant les mitochondries, en présence d'au moins un détergent, un chélateur d'ions bivalents et dans une zone de pH entre 7 et 8 ;
- l'élimination des acides nucléiques contaminants en particulier de nombreux ARNs fixés en périphérie de la mitochondrie, en présence de tampons
- 10               convenables, comprenant au moins un chélateur d'ions bivalents ;
- l'élimination des ARN cytoplasmiques situés en périphérie des mitochondries et des reliquats d'ADN nucléaire par incubation des mitochondries dans un tampon convenable dépourvu de chélateur d'ions bivalents et en présence de RNase et de DNase ; et
- 15               - l'isolement et la purification des acides nucléiques par extractions phénoliques successives.

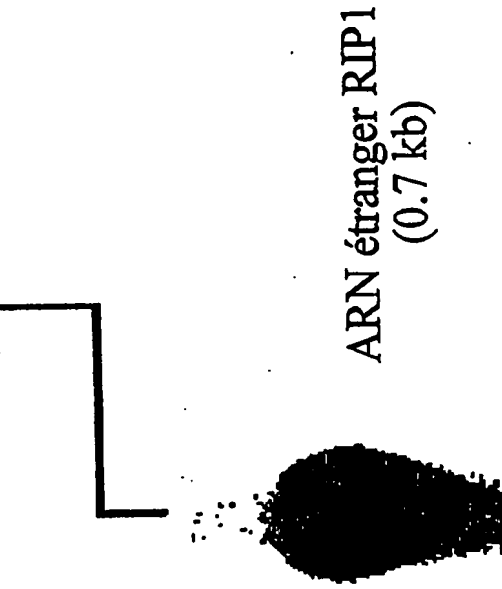
13°) Utilisation de cellules de levures  $\rho^-$  synthétiques, pour la production industrielle d'un ARN d'intérêt présélectionné.

14°) Système utile pour la production industrielle d'ARN d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 20               - des cellules de levure  $\rho^-$  synthétiques, transformées au moins par un vecteur de transcription mitochondriale tel que défini à la revendication 1,
- au moins un milieu de culture convenable permettant de sélectionner lesdites cellules transformées,
- 25               - des cellules de levure testrices, de type  $\rho^+$  mit<sup>-</sup>,
- des fermenteurs et des milieux de culture appropriés et
- des tampons appropriés pour isoler les mitochondries à partir des cellules  $\rho^-$  synthétiques et en extraire l'ARN d'intérêt.

Mitochondries génétiquement  
modifiées ( *rho*<sup>-</sup> synthétiques)  
synthétisant un ARN étranger  
et lui seul

Mitochondries  
normales



ARN mitochondrial  
endogène COX1  
(2.1 kb)

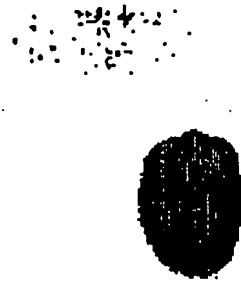


FIGURE 1

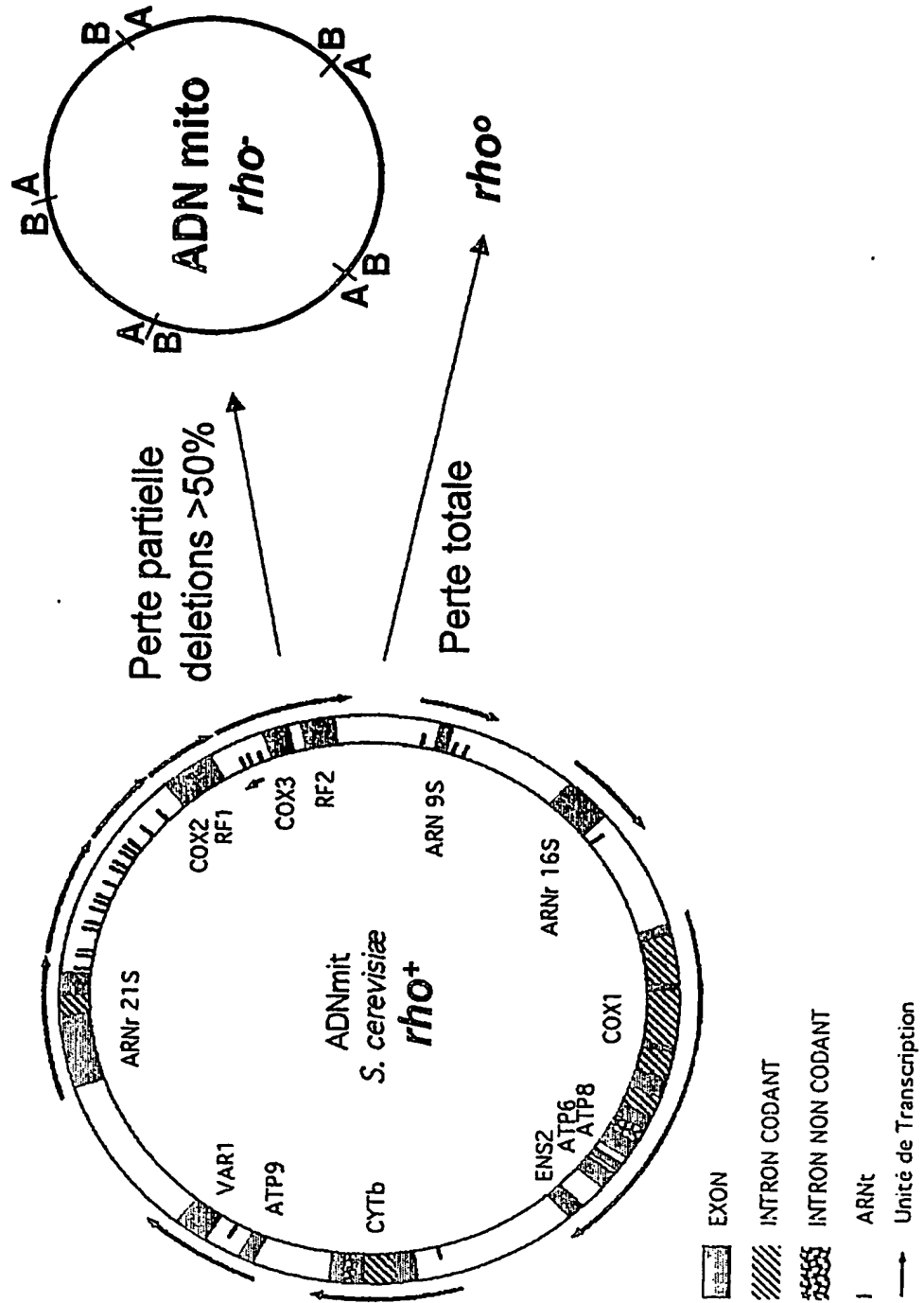


FIGURE 2

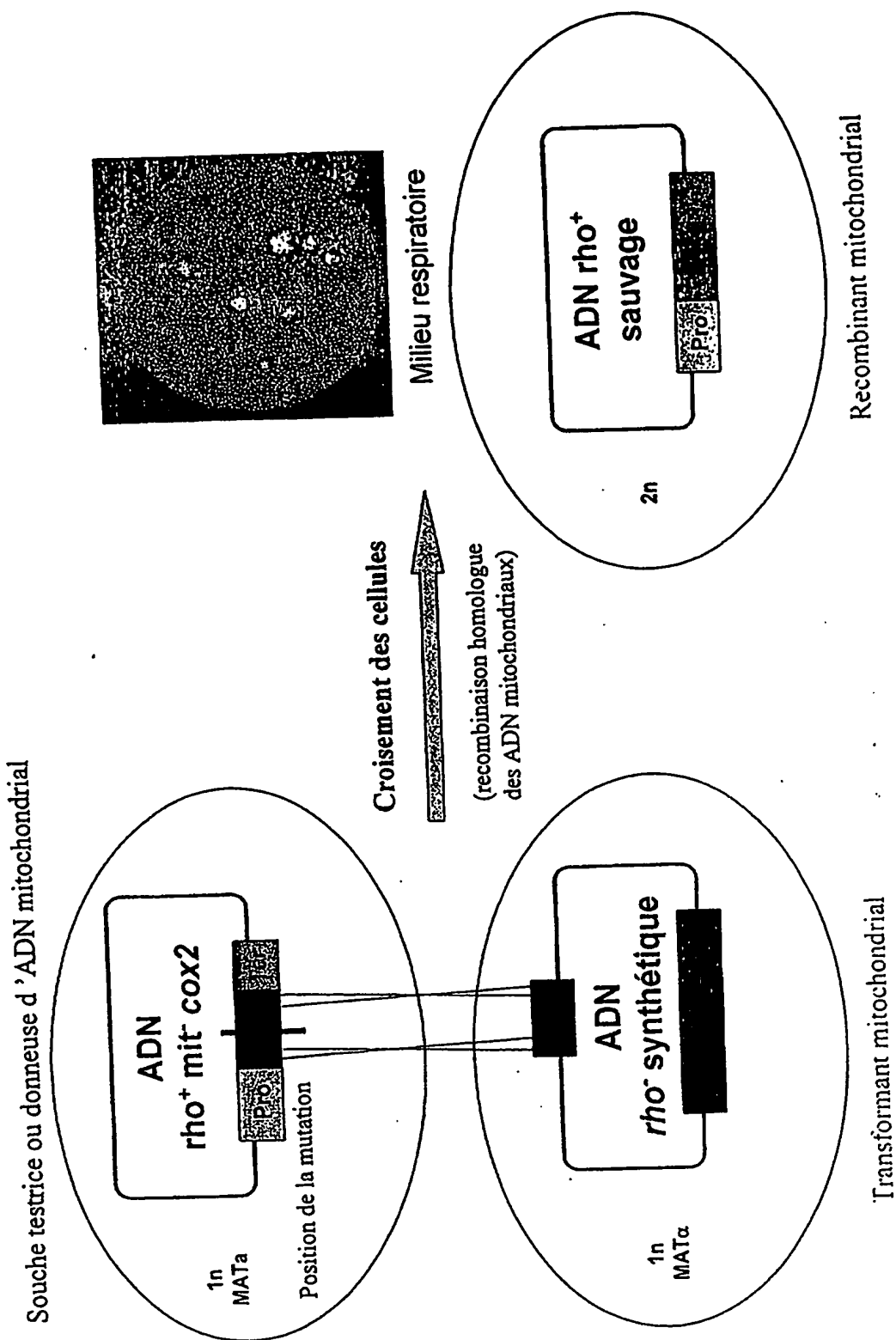
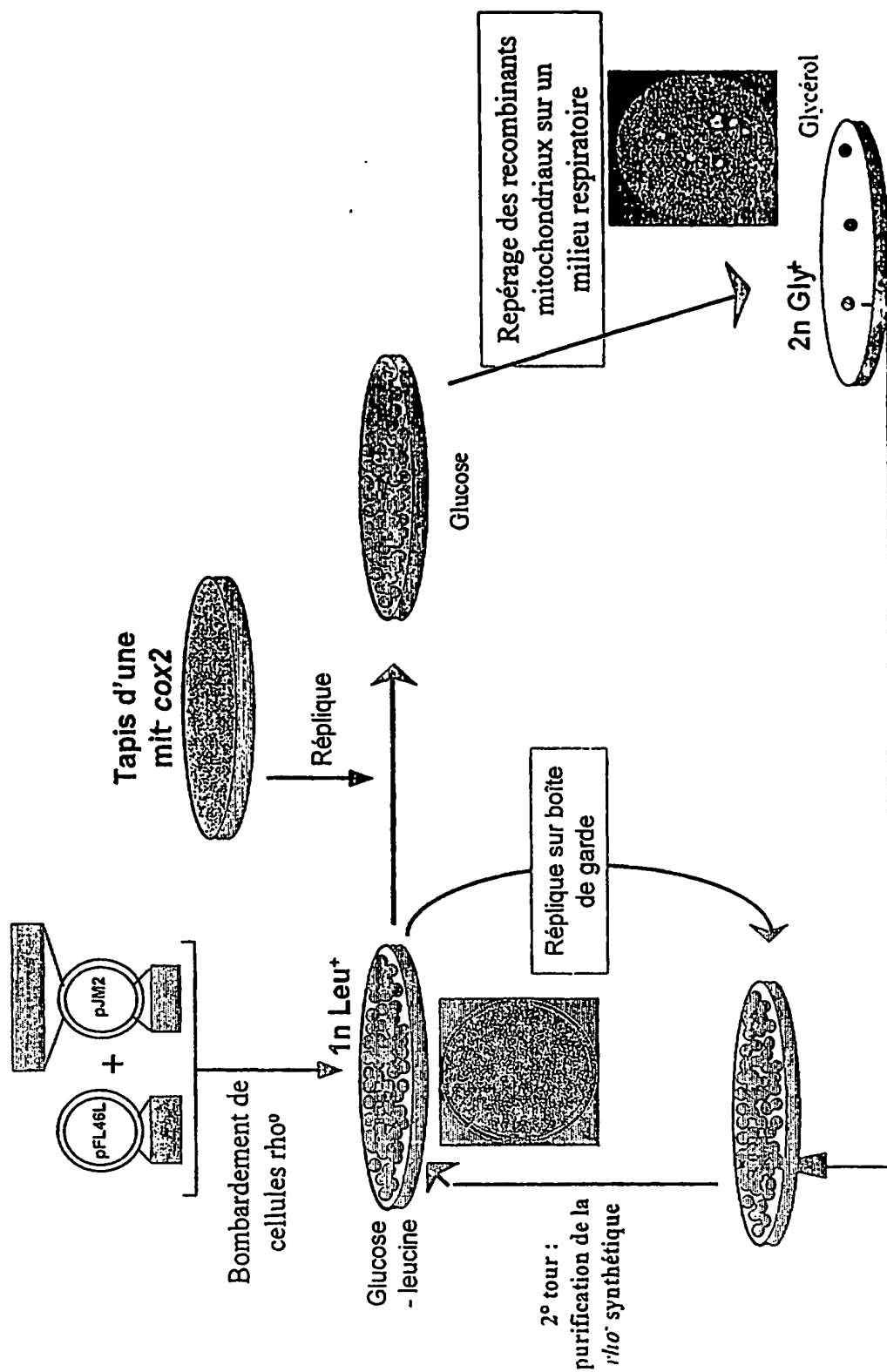


FIGURE 3



Sélection d'un clone haploïde contenant le plasmide d'intérêt dans ses mitochondries (*rho*<sup>-</sup> synthétique)

FIGURE 4



**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**cerfa**  
N° 11235\*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 113 ● W / 770601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		BLOcp644/102FR
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0309024
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDE DE PRODUCTION INDUSTRIELLE D'ARN ET SYSTÈME UTILE POUR LADITE PRODUCTION.		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b> Nom		DI RAGO
Prénoms		Jean-Paul
Adresse	Rue	121 allée des Palombes
	Code postal et ville	131341801 SAINTÉ HELENE
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b> Nom		BONNEFOY
Prénoms		Nathalie
Adresse	Rue	34 avenue des Cottages
	Code postal et ville	19111910 GIF-SUR-YVETTE
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b> Nom		DUVEZIN-CAUBET
Prénoms		Stéphane
Adresse	Rue	45 rue Boutin
	Code postal et ville	1313101010 BORDEAUX
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
Le 23 juillet 2003,  Béatrice ORES (n° 92-4046)		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**